

(51) Int Cl⁷: G 01 N 21/64, G 01 N 33/543, 33/58, B 01 L 3/00

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 02.12.99.

③ Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 08.06.01 Bulletin 01/23.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement de caractère scientifique technique et industriel — FR et BIO MERIEUX — FR.

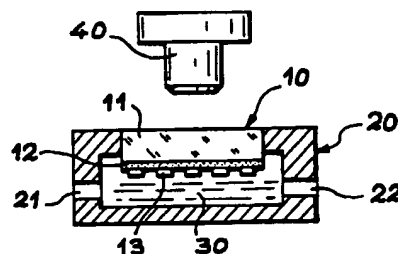
(72) Inventeur(s): PERRAUT FRANCOIS, CHATON PATRICK et POUTEAU PATRICK.

73 Titulaire(s) :

⑦ Mandataire(s) : BREVATOME.

54 AMPLIFICATION D'UN SIGNAL DE FLUORESCENCE EMIS PAR UN ECHANTILLON SURFACIQUE.

57 L'invention concerne l'amplification de la fluorescence émise par un échantillon surfacique. Le dispositif (10) comprend un support (11) transmettant tout ou partie du signal de fluorescence et destiné à supporter l'échantillon surfacique (13), une couche mince (12) d'un matériau étant intercalée entre le support (11) et l'échantillon surfacique (13), le matériau de la couche mince possédant un indice de réfraction supérieur à l'indice de réfraction du support et à l'indice de réfraction du milieu baignant l'échantillon surfacique au cours d'une mesure de fluorescence, l'épaisseur de la couche mince étant choisie pour que la couche mince (12) transmette tout ou partie du signal de fluorescence qui est mesuré après avoir traversé le support (11).



FR 2 801 977 - A1



**AMPLIFICATION D'UN SIGNAL DE FLUORESCENCE EMIS PAR UN
ECHANTILLON SURFACIQUE**

DESCRIPTION

DOMAINE TECHNIQUE

5 L'invention concerne un procédé
d'amplification d'un signal de fluorescence émis par un
échantillon surfacique supporté par un support en
réponse à un signal d'excitation. Elle concerne
également un dispositif amplifiant la fluorescence
10 émise par un tel échantillon.

ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTÉRIEURE

La mesure par fluorescence est une méthode
de mesure utilisée dans beaucoup de domaines
techniques. Elle est utilisée notamment pour exploiter
15 les dispositifs d'analyse chimique et/ou biologique
connus sous le nom de biopuce. La mesure de l'activité
biologique avec une telle puce se fait par une mesure
de l'émission de fluorescence d'une molécule fixée à
l'échantillon biologique, qui se présente sous la forme
20 d'un revêtement de surface, en utilisant par exemple un
microscope à épifluorescence, un scanner, un
fluorimètre. Pour réaliser la mesure, la puce peut être
placée dans une chambre spéciale ou cartouche. Elle
peut aussi être posée directement sur le fond d'une
25 boîte de Pétri. Elle peut encore être placée dans l'air
grâce à un support mécanique. Dans certains cas,
l'échantillon surfacique est lu en mode dit face
arrière, c'est-à-dire que la lecture se fait par
traversée d'un support supportant sur l'une de ses

faces l'échantillon surfacique, le support étant nécessairement transparent au signal de fluorescence.

Le signal d'excitation de la fluorescence est généralement dirigé vers l'échantillon au travers de son support qui a avantageusement la forme d'une lame. Un autre moyen d'exciter la fluorescence est de générer des ondes évanescentes en injectant la lumière d'excitation par la tranche de la lame ou en réalisant un couplage par un prisme.

10 Dans d'autres cas, l'échantillon surfacique est lu en mode dit face avant, la lecture se faisant directement sur l'échantillon surfacique disposé sur le support.

L'échantillon surfacique peut être
15 constitué à partir d'une surface biospécifique formée sur une face du support et servant de phase de capture à un corps porteur d'un marqueur fluorescent. On peut ainsi former un complexe, par exemple un duplex d'acides nucléiques. La fabrication de la surface
20 biospécifique peut être réalisée par une synthèse combinatoire des sondes, par dépôt des sondes par une technique de projection ou d'une autre façon. Ce complexe peut aussi être une association anticorps-antigènes, les anticorps déposés sur la face du support
25 formant la surface biospécifique. L'épaisseur de la surface formant le complexe est comprise entre quelques nanomètres et quelques centaines de nanomètres. Le complexe peut également être apporté sur la surface après sa formation, par exemple par séchage ou
30 adsorption du complexe sur la face du support.

La première mention de la possibilité d'obtenir un renforcement de fluorescence est donnée dans l'article intitulé "Model for Raman and fluorescent scattering by molecules in small particles"
35 de H. CHEW et al., Physical Review A, 13(1), pages 396

à 404, 1976. Cet article, qui traite simultanément la diffusion Raman et la fluorescence, concerne un modèle théorique qui établit que le champ rayonné par une molécule fluorescente n'est pas isotrope lorsque celle-ci est placée dans un corps sphérique (cellule, goutte d'aérosol). Le modèle théorique ne décrit que la distribution angulaire d'émission de la lumière mais ne conclut pas sur la possibilité d'appliquer ce principe pour obtenir une meilleure sensibilité.

10 Plus récemment, un modèle dédié à la fluorescence, mais avec un formalisme physique différent, a été proposé par J. ENDERLEIN et al. dans un article intitulé "Highly efficient optical detection of surface generated fluorescence", Applied Optics, 15 Vol. 38, n° 4, 1999, pages 724 à 732.

Une revue des phénomènes de fluorescence moléculaire au voisinage des interfaces a été établie par R.R. CHANCE et al. dans "Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces", Advanced in Chemical 20 Physics, vol XXXVII, pages 1 à 65 - Prigogine I., Rice S.R., 1978. Cette revue ne traite que des phénomènes de temps de relaxation des molécules ionisées et des variations des rendements quantiques apparents. Si un modèle de calcul est présenté pour les empilements 25 diélectriques, il ne concerne également que les phénomènes de temps de relaxation des molécules ionisées et les variations des rendements quantiques apparents. Enfin, il est supposé que l'émission de fluorescence est isotrope dans l'espace, ce qui n'est 30 pas le cas.

D.A. WEITZ et al., dans un article intitulé "The enhancement of Raman scattering, resonance Raman scattering and fluorescence from molecules adsorbed on a rough silver surface", Journal of Chemical Physics, 35 79(9), pages 5324 à 5338, 1983, proposent un modèle

bien adapté à l'émission de fluorescence de molécules déposées sur une surface rugueuse ou sur une surface plane sur laquelle des îlots d'argent colloïdal ont été déposés. Des expériences ont été réalisées et valident

5 bien le modèle. Selon cette conception, la lecture de fluorescence ne peut se faire qu'en face avant. Le phénomène physique mis en œuvre est un couplage électromagnétique entre une résonance de plasmon à la surface de l'argent colloïdal pour créer un champ

10 électromagnétique local très intense et les molécules fluorescentes. Le gain en fluorescence est alors fonction de la position des molécules par rapport aux îlots d'argent. S'il y a contact, les molécules sont adsorbées à la surface et la fluorescence est inhibée

15 comme le signale l'article de K. SOKOLOV et al. intitulé "Enhancement of molecular fluorescence near the surface of colloidal metal film", Analytical Chemistry, Vol. 70, n° 18, pages 3898 à 3905, 15 septembre 1998.

20 La demande internationale WO-A-99/23 492 divulgue une technique d'amplification de la fluorescence qui met en œuvre une surface propre à renforcer la fluorescence, cette surface étant intercalée entre un support et le complexe biologique

25 déposé sur le support, la mesure étant réalisée au travers du support. Cette surface intermédiaire doit cependant être texturée et, pour cela, le matériau formant cette surface est choisie parmi les membranes en nylon, matériau et texture provoquant la diffusion

30 du signal de fluorescence, phénomène que l'invention évite.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

L'invention propose une autre manière d'obtenir l'amplification d'un signal de fluorescence tout en évitant les inconvénients des méthodes ou dispositifs de l'art connu.

L'invention met en œuvre le fait que des molécules placées sur une surface constituent une discontinuité dans l'indice de réfraction et qu'elles émettent la plus grande partie de leur fluorescence dans le milieu qui possède l'indice le plus élevé. La distribution angulaire de fluorescence de molécules en surface est très différente de celle de molécules en volume. Dans le cas d'un liquide, on considère que l'émission fluorescente est isotrope car les molécules fluorescentes ne sont pas orientées les unes par rapport aux autres (distribution aléatoire de l'orientation des moments dipolaires). Le phénomène est différent lorsque les molécules fluorescentes constituent une couche mince d'une dizaine de nanomètres à quelques centaines de nanomètres. Le signal émis en fluorescence est fonction de l'orientation des dipôles électriques constitués par les molécules fluorescentes. Il est donc favorable, pour une fluorescence en surface, de disposer les molécules fluorescentes à l'interface de deux milieux d'indice de réfraction très différents.

On peut ainsi utiliser un matériau d'indice de réfraction élevé sous forme d'une couche suffisamment mince pour être transparente au signal de fluorescence, cette couche mince étant supportée par un support transparent au signal de fluorescence.

Un premier objet de l'invention est un procédé d'amplification d'un signal de fluorescence émis par un échantillon surfacique supporté par un support en réponse à un signal d'excitation, le support transmettant tout ou partie du signal de fluorescence, consistant à intercaler une couche mince d'un matériau entre le support et l'échantillon surfacique, le matériau de la couche mince possédant un indice de réfraction supérieur à l'indice de réfraction du support et à l'indice de réfraction du milieu baignant l'échantillon surfacique, l'épaisseur de la couche mince étant choisie pour que la couche mince transmette tout ou partie du signal de fluorescence qui est mesuré après avoir traversé le support transparent.

L'échantillon surfacique peut être supporté par un support réalisé en un matériau choisi parmi le verre, le quartz, la silice, les matières plastiques telles que le polystyrène, le polypropylène, les polycarbonates, les polyméthylmétacrylates.

Le procédé peut consister à intercaler, entre le support et l'échantillon surfacique, une couche mince d'un matériau choisi parmi le nitrure de silicium, les oxydes de titane, l'oxyde d'aluminium, ZrO_2 , ZrO_4Ti , HfO_2 , Y_2O_3 , le diamant, MgO , les oxynitrides ($Si_xO_yN_z$), les matériaux fluorés comme YF_3 ou MgF_2 . Cette couche mince peut être aussi obtenue par empilement de plusieurs sous-couches dont les propriétés optiques et l'épaisseur confèrent à l'ensemble représenté par cette dernière les caractéristiques nécessaires (voir A. HERPIN, C.R. Acad. Sciences, Paris, 225, 182, 1947).

La couche mince peut être une couche obtenue sur le support par l'une des méthodes suivantes : évaporation sous vide, réplique, report, dépôt de film, par des procédés de type CVD (LPCVD, PECVD...) ou de type PVD, par report de films, par

procédé sol-gel. Elle peut être une couche reportée sur le support par l'une des méthodes suivantes : collage et adhérence moléculaire.

- 5 ladite couche mince obtenue sur le support.

L'échantillon surfacique peut être formé par un complexe associant une surface biospécifique à des molécules d'échantillon porteuses d'un marqueur fluorescent.

- 10 Le milieu baignant l'échantillon peut être un liquide, un gel ou un gaz.

- Un deuxième objet de l'invention est un dispositif amplifiant la fluorescence émise par un échantillon surfacique par l'un des procédés ci-dessus,
- 15 le dispositif comprenant un support transmettant tout ou partie du signal de fluorescence et destiné à supporter l'échantillon surfacique, une couche mince d'un matériau étant intercalée entre le support et l'échantillon surfacique, le matériau de la couche
- 20 mince possédant un indice de réfraction supérieur à l'indice de réfraction du support et à l'indice de réfraction du milieu baignant l'échantillon surfacique au cours d'une mesure de fluorescence, l'épaisseur de la couche mince étant choisie pour que la couche mince
- 25 transmette tout ou partie du signal de fluorescence qui est mesuré après avoir traversé le support.

- Un troisième objet de l'invention consiste en une biopuce, caractérisée en ce qu'elle comprend le dispositif ci-dessus, le dispositif supportant une
- 30 pluralité d'échantillons surfaciques constituant autant de zones de reconnaissance.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins annexés parmi lesquels :

- la figure 1 représente un dispositif selon la présente invention dans une première configuration de lecture d'un signal de fluorescence,
- la figure 2 représente un dispositif selon la présente invention dans une deuxième configuration de lecture d'un signal de fluorescence,
- la figure 3 représente un dispositif selon la présente invention dans une troisième configuration de lecture d'un signal de fluorescence.

DESCRIPTION DETAILLÉE DE MODES DE RÉALISATION DE L'INVENTION

L'invention consiste à intercaler une couche mince entre un support transparent au signal de fluorescence et un échantillon surfacique plongé dans un milieu et à mesurer la fluorescence au travers du support.

Le matériau constituant la couche mince est choisi de façon que son indice de réfraction soit supérieur à l'indice de réfraction du matériau constituant le support et supérieur à l'indice de réfraction du milieu baignant l'échantillon surfacique.

Le milieu baignant l'échantillon surfacique est par exemple un tampon liquide si l'on veut parfaitement contrôler l'environnement pour la

fluorescence (pH, salinité). Le milieu peut être un gel si l'on veut réduire la photodestruction ou "bleaching" des molécules fluorescentes. Ce milieu peut encore être un gaz (air, gaz neutre) si le complexe fluorescent
5 exige de telles conditions de lecture.

A titre d'exemple, le support est une lame de silice (SiO_2) de 700 μm d'épaisseur et d'indice de réfraction 1,485 à 650 nm. La couche mince peut être une couche de nitrure de silicium (Si_3N_4) de 150 nm
10 d'épaisseur et d'indice de réfraction 1,997 pour la même longueur d'onde. L'échantillon surfacique peut être un complexe à base d'ADN marqué avec une cyanine fluorescente (Cy5-Amersham, marque déposée). Le milieu baignant l'échantillon peut être constitué d'un tampon
15 liquide pour le lavage (SSPE 6X/Triton $\times 100$ à 0,005%), d'indice 1,34. Pour un tel dispositif, on mesure une amplification de la fluorescence de 60% par rapport à la mesure effectuée dans les mêmes conditions pour le complexe déposé directement sur le support, sans la
20 présence de la couche mince. La mesure est faite avec un microscope à épifluorescence et une caméra CCD. L'excitation de fluorescence est centrée sur 635 nm et la mesure de l'émission est centrée sur 670 nm. La valeur du gain est fonction du système de mesure
25 (longueur d'onde, ouverture numérique des optiques), du marqueur utilisé (orientation du moment dipolaire) et des caractéristiques de la couche mince (indice de réfraction, épaisseur).

La figure 1 représente un dispositif selon
30 l'invention disposé dans un boîtier afin d'effectuer la mesure de fluorescence. Le dispositif 10 est constitué d'un support transparent 11, en forme de lame, recouvert sur l'une de ses faces d'une couche mince 12. Un échantillon surfacique 13 est déposé sur la face

libre de la couche mince 12. Le dispositif 10 est par exemple constitué des éléments décrits ci-dessus.

Le dispositif 10 est disposé, pour la mesure de fluorescence, dans un logement prévu dans la paroi supérieure d'un boîtier 20. Il est placé de façon que l'échantillon surfacique 13 soit dirigé vers l'intérieur du boîtier 20. Le boîtier possède un orifice d'entrée 21 et un orifice de sortie 22 afin de mettre l'échantillon surfacique en contact avec un liquide 30 constituant le milieu baignant l'échantillon surfacique.

Le signal de fluorescence est recueilli par un instrument de mesure 40. Comme le montre bien la figure 1, le signal de fluorescence parvient à l'instrument de mesure 40 en traversant la couche mince 12 et le support transparent 11. Il s'agit du mode de lecture dit en face arrière.

La figure 2 représente le même dispositif 10 disposé sur le fond d'une boîte de Pétri 50 contenant le milieu 30. La lecture de fluorescence au moyen de l'instrument de mesure 40 se fait également en face arrière.

La figure 3 représente le même dispositif 10 placé dans l'air pour effectuer la mesure de fluorescence. Le dispositif 10 est maintenu par sa périphérie au moyen d'un support mécanique comprenant une plaque 60 percée d'une ouverture 61 permettant à l'échantillon surfacique d'être en contact avec l'air 62.

Le support peut être une plaque de verre, de silice ou de polystyrène. Il est transparent pour le domaine spectral de la mesure de fluorescence. La couche mince déposée sur une face du support peut être fabriquée par évaporation sous vide ou par réplique (techniques des couches minces optiques) pour des

matériaux comme le nitrure de silicium, l'oxyde de titane, l'oxyde d'aluminium. Elle peut être déposée sous la forme d'un film ou reportée sur le support (par collage, par adhérence moléculaire) dans le cas d'une

5 couche mince d'épaisseur supérieure à quelques μm .

Différents essais ont été effectués pour démontrer l'efficacité de l'invention. Les essais ont porté sur plusieurs dispositifs :

- un support en verre selon l'art connu,

10 c'est-à-dire sans couche mince amplificatrice de fluorescence,

- un dispositif selon l'invention dont la couche mince est en nitrure de silicium,

- un dispositif selon l'invention dont la

15 couche mince est en nitrure de silicium recuit (le recuit effectué sous azote permet de densifier la couche de nitrure).

La lecture de fluorescence a été effectuée au moyen d'un microscope à épifluorescence équipé pour

20 le marqueur Cy5 et au moyen d'une caméra CCD numérique refroidie. Deux mesures ont été faites par dispositif : une mesure en face avant et une mesure en face arrière. La mesure en face avant s'effectue en plaçant l'échantillon surfacique en face de l'instrument de

25 mesure, le signal de fluorescence ne traversant donc pas le support ou le dispositif.

Les mesures effectuées montrent un renforcement de la fluorescence de 1,6 fois pour un dispositif à couche mince en Si_3N_4 par rapport à un

30 simple support en verre, et un renforcement de la fluorescence de 2,4 fois pour un dispositif à couche mince en Si_3N_4 ayant subi un recuit par rapport au simple support en verre.

Le dispositif de l'invention est utilisable

35 dans une biopuce comportant une pluralité de zones de

reconnaissance moléculaire. On entend par biopuce une puce ou un support présentant à sa surface une ou plusieurs zones, dites zones de reconnaissance, équipées de molécules présentant des propriétés de reconnaissance. Les molécules de reconnaissance peuvent être, par exemple, des oligonucléotides, des polynucléotides, des protéines telles que des anticorps ou des peptides, des lectines ou tout autre système du type ligand-récepteur. En particulier les molécules de reconnaissance peuvent comporter des fragments d'ADN ou d'ARN.

Lorsque la biopuce est mise en contact avec un échantillon à analyser, les molécules de reconnaissance sont susceptibles d'interagir, par exemple par complexation ou par hybridation avec des molécules dites "molécules cibles" de l'échantillon. Ainsi, en équipant une biopuce d'une pluralité de zones de reconnaissance avec différentes molécules de reconnaissance sélectivement sensibles à différentes molécules cibles, il est possible de détecter et éventuellement de quantifier une grande variété de molécules contenues dans l'échantillon.

Les complexes formés sur la biopuce peuvent être repérés au moyen d'un marquage fluorescent appliqué aux molécules cibles de l'échantillon. Ainsi, le support de la biopuce est le support du dispositif de l'invention revêtu de la couche mince et les zones de reconnaissance de la biopuce sont les échantillons surfaciques.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'amplification d'un signal de fluorescence émis par un échantillon surfacique (13) supporté par un support (11) en réponse à un signal d'excitation, le support (11) transmettant tout ou partie du signal de fluorescence, consistant à intercaler une couche mince (12) d'un matériau entre le support (11) et l'échantillon surfacique (13), le matériau de la couche mince possédant un indice de réfraction supérieur à l'indice de réfraction du support et à l'indice de réfraction du milieu (30,62) baignant l'échantillon surfacique (13), l'épaisseur de la couche mince étant choisie pour que la couche mince (12) transmette tout ou partie du signal de fluorescence qui est mesuré après avoir traversé le support (11).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'échantillon surfacique (13) est supporté par un support (11) réalisé en un matériau choisi parmi le verre, le quartz, la silice, les matières plastiques telles que le polystyrène, le polypropylène, les polycarbonates, les polyméthylmétacrylates.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste à intercaler, entre le support (11) et l'échantillon surfacique (13), une couche mince (12) d'un matériau choisi parmi le nitruure de silicium, les oxydes de titane, l'oxyde d'aluminium, ZrO_2 , ZrO_4Ti , HfO_2 , Y_2O_3 , le diamant, MgO , les oxynitruures ($Si_xO_yN_z$), les matériaux fluorés, YF_3 , MgF_2 .

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite couche mince (12) est une couche obtenue sur le support

(11) par l'une des méthodes suivantes : évaporation sous vide, réplique, report, dépôt de film par des procédés de type CVD (LPCVD, PECVD...) ou de type PVD, par report de films, par procédé sol-gel.

5 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite couche mince (12) est une couche reportée sur le support (11) par l'une des méthodes suivantes : collage et adhérence moléculaire.

10 6. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce qu'on procède à un recuit de ladite couche mince (12) obtenue sur le support (11).

15 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'échantillon surfacique (13) est formé par un complexe associant une surface biospécifique à des molécules d'échantillon porteuses d'un marqueur fluorescent.

20 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le milieu (30,62) baignant l'échantillon surfacique (13) est un liquide, un gel ou un gaz.

25 9. Dispositif (10) amplifiant la fluorescence émise par un échantillon surfacique (13) par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, le dispositif comprenant un support (11) transmettant tout ou partie du signal de fluorescence et destiné à supporter l'échantillon surfacique (13), une couche mince (12) d'un matériau étant intercalée entre le support (11) et l'échantillon surfacique (13), le matériau de la couche mince possédant un indice de réfraction supérieur à l'indice de réfraction du support et à l'indice de réfraction du milieu baignant l'échantillon surfacique au cours d'une mesure de fluorescence, l'épaisseur de la couche mince étant choisie pour que la couche mince (12) transmette

30

tout ou partie du signal de fluorescence qui est mesuré après avoir traversé le support (11).

10. Biopuce à lecture par fluorescence, mettant en œuvre un procédé selon l'une quelconque des
5 revendications 1 à 8, la biopuce comprenant un support transmettant tout ou partie du signal de fluorescence et destiné à supporter une pluralité d'échantillons surfaciques constituant autant de zones de reconnaissance, une couche mince d'un matériau étant
10 intercalée entre le support et les échantillons surfaciques, le matériau de la couche mince possédant un indice de réfraction supérieur à l'indice de réfraction du support et à l'indice de réfraction du milieu baignant les échantillons surfaciques au cours
15 d'une mesure de fluorescence, l'épaisseur de la couche mince étant choisie pour que la couche mince transmette tout ou partie du signal de fluorescence qui est mesuré après avoir traversé le support.

1 / 1

FIG. 1

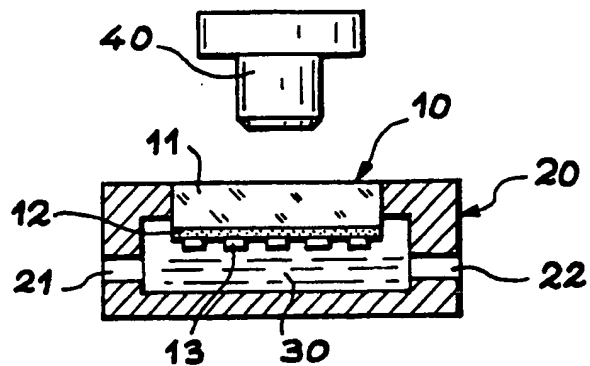


FIG. 2

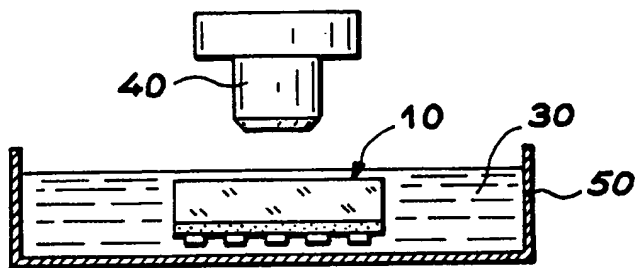
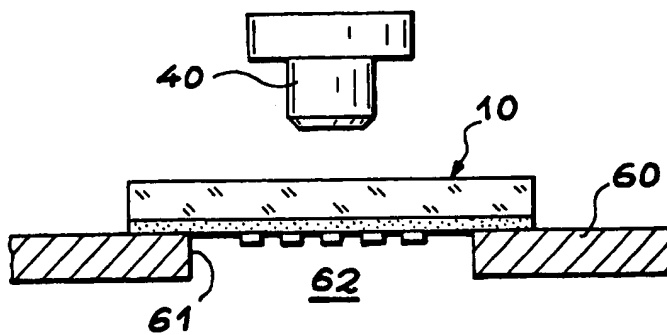


FIG. 3





RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2801977

N° d'enregistrement
national

FA 583183

FR 9915193

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 5 822 472 A (NEUSCHAEFER DIETER ET AL) 13 octobre 1998 (1998-10-13) * colonne 3, ligne 26 - ligne 50 * * colonne 6, ligne 5 - ligne 8 * * colonne 8, ligne 5 - ligne 17 * * colonne 9, ligne 30 - ligne 57 * * colonne 10, ligne 49 - colonne 11, ligne 10 * * figure 1 *	1-3,7-10	G01N21/64 G01N33/543 G01N33/58 B01L3/00
X	WO 90 06503 A (ARES SERONO RES & DEV LTD) 14 juin 1990 (1990-06-14) * page 1, ligne 24 - page 3, ligne 7 * * page 7, ligne 1 - page 8, ligne 28 * * page 13, ligne 4 - page 15, ligne 17 * * figure 1 *	1,2,7-10	
X	US 5 082 629 A (GOLDMAN DON S ET AL) 21 janvier 1992 (1992-01-21) * colonne 6, ligne 56 - colonne 7, ligne 33 * * colonne 10, ligne 26 - ligne 38 * * revendications 1,11; figure 1 *	1-3,9	
A	US 4 649 280 A (HOLLAND WILLIAM R ET AL) 10 mars 1987 (1987-03-10) * colonne 3, ligne 3 - colonne 4, ligne 65 * * revendication 1; figures *	1,2,7,9	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 août 2000		Krametz, E	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)